

令和元年6月10日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01384

研究課題名(和文)近赤外線蛍光顕微鏡による糖尿病性冠微小循環障害時の心内膜側虚血発症メカニズム解明

研究課題名(英文)The onset mechanism of subendocardial ischemia during dysfunction of coronary microcirculation in diabetes mellitus by an infrared fluorescence microscope

研究代表者

矢田 豊隆 (YADA, TOYOTAKA)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00210279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外線蛍光顕微鏡を用いた虚血心内・外膜側副血行路冠微小循環において正常群に比べ糖尿病群において冠血管予備能低下を認め、一酸化窒素(NO)の血管内皮機能低下を認め、その代償機能として内皮依存性過分極としての過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)が作用した。eNOSは、糖尿病群虚血部において低下を認めた。心外膜側冠動脈に比べ心筋内微小血管におけるcaveolin-1は、有意に高かった。ARBの投与群でブラジキニンを介した血管拡張反応を評価した所、細動脈で血管拡張を認め、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生増加を認めた。糖尿病性虚血心内膜側冠微小循環障害時、NO合成障害を認め、その代償機構としてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が関与する事が窺われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当教室で応用開発した近赤外線蛍光顕微鏡を用いて、糖尿病性心筋虚血モデルの心内膜側冠微小循環及び冠動脈側副血行路の血管拡張効果を評価し、内皮依存性血流調節因子の定量評価を行い、心内膜側虚血発症及び側副血行路血流改善の両メカニズムを解明する。冠動脈の豊富な側副血行路を検出し、術後虚血性冠微小循環障害を改善し、内皮機能改善薬が、内因性過酸化水素と一酸化窒素を介した血行改善を認める事が予想される。これらを実証されれば、冠微小循環障害や冠微小側副血行路血流の改善評価を可能にする診断治療に発展する基礎的研究となり、将来的にヒト冠動脈バイパス術への応用も可能で重要な学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the endothelium-dependent hyperpolarization (EDH)-mediated responses to compensate reduced nitric oxide (NO)-mediated responses in diabetes mellitus (DM) during occlusion in dogs in vivo. Canine subepicardial and subendocardial collateral coronary small arteries (CSA>100 micrometer) and arterioles (CA<100 micrometer) were observed by an infrared fluorescence microscope. Experiments were performed during occlusion of the left anterior descending coronary artery (LAD 90 min). Caveolin-1 in the LAD area were greater in coronary microvessels than in conduit arteries in the control. NO-mediated vasodilations of CSA to bradykinin did not increase in DM (before and after coronary occlusion at 85 min) associated with decreased eNOS phosphorylation at Ser1177 compared with baseline controls, and were restored by compensation of EDH, and were suppressed by KCa channel blockade.

NO-mediated vasodilations of CSA during occlusion are compensated by EDH of CA in dogs of DM in vivo.

研究分野：冠微小循環

キーワード：内皮依存性過分極 過酸化水素 caveolin-1 一酸化窒素 心内膜側微小血管 血管内皮 近赤外線蛍光顕微鏡 糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

内皮由来弛緩因子 (EDRF) は、一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)、内皮依存性過分極(EDH)からなる。EDH としての内因性過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)の世界的第一人者で連携研究者の東北大学循環器内科下川宏明教授らは、EDH の本体として考えられている H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が、NO 合成(NOS)時、血管内皮で産生される superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)を分解する Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD)から産生され、最終的に血管平滑筋で K<sub>Ca</sub> チャネルを開口し、弛緩する事を明らかにした。最近 caveolin-1 が、EDH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を促進し、NO を抑制する事が明らかになった。内因性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、比較的低濃度(100μM 以下)でヒト摘出冠細動脈を拡張する事が知られている。NOS 以外の endothelial oxidase から産生される NADPH 等(血管障害性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)とは、産生ルートが異なり、唯一 NOS を介した Cu,Zn-SOD 由来 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> のみが血管拡張作用(血管拡張性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を持つ事が知られている。EDRF の主な作用の場として、心臓では、NO が主に小動脈(100μm 以上)に作用し、EDH は細動脈(100μm 未満)に作用する事から、冠微小循環領域の評価が重要である。冠動脈狭窄後の末梢血管へ冠動脈バイパス術施行時、術前冠動脈造影による側副血行路等の冠微小血管を評価するには、低解像度のため限界があった。また、心内膜側冠微小循環の血流動態の評価は、心筋虚血の発症メカニズムを理解する上で極めて重要であるが、方法論的に生体内評価は困難であった。唯一、当教室が開発した非蛍光可視型 CCD 生体顕微鏡により、拍動下生体内心内・外膜側微小血管の直接的観察に成功した。しかし、非蛍光顕微鏡は血管描出時、コントラスト増強のためにグリーン(赤血球の赤色の補色)フィルターを装着しており、心内膜側微小血管は深緑色に見え、血液充満の左室内検出が困難であった。閉鎖空間の左室内心内膜側冠微小血管観察には、インドシアニングリーン(ICG)を用いた近赤外線白色蛍光顕微鏡による観察が有用と思われる、当教室で応用開発に至った。

### 2. 研究の目的

糖尿病発症後、血管内皮障害を発症し、その後、動脈硬化へと進展すると、最終的に急性心筋梗塞を惹起する事がある。心筋梗塞時、冠微小血管側副血行路の存在は、心筋虚血改善を促す。一方、EDRF の主な作用の場は、冠微小循環領域である。特に易虚血性を示す心内膜側領域を評価することは、心筋虚血時、冠微小循環レベルでの虚血発症メカニズム及び側副血行路の EDRF を介した血流改善メカニズムを理解する上で極めて重要である。今回、当教室応用開発の近赤外線蛍光顕微鏡(最大倍率 150 倍)を用いて糖尿病性心筋虚血モデルの心内膜側冠微小循環及び冠動脈側副血行路の血管拡張効果を評価し、血流増加に關与する EDRF の定量評価を行い、心内膜側虚血発症及び側副血行路血流改善の両メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

【平成28年度】近赤外線顕微鏡を用いた冠動脈心外膜側副血行路、冠微小循環改善評価

(1) 近赤外線蛍光 CMOS カメラ生体顕微鏡による虚血時冠微小血管側副血行路の血流改善評価

1) 虚血部(LAD)と非虚血部(LCX)間の側副血行路の評価: 正常犬群と糖尿病犬群(1週間前アロキサン静注)の冠動脈側副血行路の蛍光観察を行う。冠血管予備能評価として反応性充血を評価。LAD冠動脈閉塞後、同顕微鏡より側副血行路と虚血LAD領域の血流改善を両群で比較。  
2) 側副血行路のEDH関与の評価: EDH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の効果をみるためEDH阻害薬(catalase 1200U/kg IC, Apamin+Charybdotoxin 1μmol/L and 100nmol/L, IC)投与前後の虚血時冠微小血管側副血行路に内皮由来拡張物質(ブラジキニン3μg/min IC)を投与。

【平成29年度】同実験モデルのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とNO産生ルート評価及び血管拡張薬による血流改善評価

(1) 前年度に引き続き、EDH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生ルート評価: 心筋内心内・外膜側摘出血管を採取し、ELISAでCu,Zn-SOD、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、caveolin-1濃度を定量比較する。また、Cu,Zn-SOD以外のルートからのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生を介した血管拡張を除外するためNADPH阻害薬(apocynin 100μM)、Lipoxygenase 阻害薬(nordihydroguaiaretic acid, 1 μM)、xanthine oxidase 阻害薬(allopurinol 100 μM)、

mitochondrial electron transport chain阻害薬(rotenone 1 μM)投与前後のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度の比較を行い、Cu,Zn-SOD以外のルートからのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が血管拡張に関与しない事を明らかにする。NO産生能計測：EDH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>定量を行う。

(2) 血管拡張薬による血流改善評価：虚血後側副血行路の血流改善のため、血管内皮機能改善薬ARB(olmesartan 10μg/kg/min IC)]の投与群と非投与群の比較。近赤外線蛍光顕微鏡によるEDH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の血管拡張効果および定量評価(Amplex redを用いたELISA法によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の蛍光発光評価を両群で行う。

【平成30年度】同顕微鏡による糖尿病性心筋虚血時の心内膜側微小血管の観察評価とNO濃度の評価

(1) 虚血心内膜側微小血管の蛍光顕微鏡による観察：同蛍光顕微鏡により、正常犬群と糖尿病犬群の虚血モデルを対象に虚血(20秒間反応性充血、LAD狭窄)前後に心内膜側微小血管の観察評価を行う。心内・外膜側冠微小血管にブラジキニンを投与し、PGI<sub>2</sub>、NO、EDH阻害薬を段階的阻害後両血管のEDHによる拡張能の違いを評価。

(2) 心筋内心内・外膜側摘出血管をwestern blot法によりNO定量的評価

#### 4. 研究成果

平成28年度 近赤外線顕微鏡を用いた虚血心外膜側副血行路、冠微小循環改善評価；正常群に比べ糖尿病群において冠血管予備能の低下を認め、冠動脈閉塞時には、虚血心外膜側副血行路において特にNOの血管内皮機能低下を認め、その代償機能として内皮依存性過分極としてのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が作用した。

平成29年度 心筋虚血モデルのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とNO産生ルート評価及び血管拡張薬による血流改善評価

(1) EDH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生ルート評価(ELISA)：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は、正常群に比べ糖尿病群で減弱した。eNOSは、正常群の非虚血部に比べて、糖尿病群の虚血部において低下を認めた。心外膜側冠動脈に比べ、心筋内微小血管におけるcaveolin-1は、有意に高かった。しかし、両群の間で有意差を認めなかった。また、Cu,Zn-SOD以外のルートからのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生を介した血管拡張を除外するためNADPH阻害薬(apocynin)、Lipoxygenase阻害薬(nordihydroguaiaretic acid)、xanthine oxidase阻害薬(allopurinol)、mitochondrial electron transport chain阻害薬(rotenone)投与前後の血管拡張反応の比較を行い、Cu,Zn-SOD以外のルートからのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が血管拡張に関与するか否かを明らかにした。各H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻害薬投与前後のEDHを介した血管拡張反応は、正常群と比較して有意な変化を認められず、血管拡張に関与しなかった。(2)血管拡張薬による血流改善評価：虚血後側副血行路の血流改善のため、血管内皮機能改善薬 アンギオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の投与群と非投与群の比較。ARBの投与群と非投与群でブラジキニンを介した血管拡張反応を評価した所、細動脈で血管拡張を認め、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生増加を認めた。

平成30年度 近赤外線同顕微鏡による糖尿病性心筋虚血時の心内膜側微小血管の観察及びNOの評価；心内膜側微小血管においても、正常群に比べ糖尿病群において冠血管予備能の低下を認め、虚血糖尿病群において、非虚血正常群に比べリン酸化eNOSの低下を認めた。

以上より、糖尿病性虚血心内膜側冠微小循環障害時、NO合成障害を認め、その代償機構としてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>増加による細動脈拡張、caveolin-1、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が虚血改善拡張因子として関与する事が窺われた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Toyotaka Yada, Hiroaki Shimokawa, Hiroyuki Tachibana, Endothelium-dependent hyperpolarization-mediated vasodilatation compensates nitric oxide-mediated endothelial dysfunction during ischemia in diabetes-induced canine coronary collateral microcirculation in vivo. *Microcirculation*. 25:e12456(1)-(8), 2018

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 矢田豊隆, 下川宏明, 立花博之. 近赤外線蛍光顕微鏡と ICG 冠動脈内投与によるイヌ生体内冠微小動脈におけるブラジキニン投与後、内皮由来過分極 / 過酸化水素の役割. 第 47 回日本心脈管作動物質学会. 2018
2. 矢田豊隆, 下川宏明. Role of Endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated Dilatation of Coronary Microvessels during Coronary Occlusion in Dogs in Vivo. -An Infrared Fluorescence Microscopic Study-. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 2018
3. 矢田豊隆, 下川宏明, 立花博之. 近赤外線蛍光顕微鏡とイヌ生体内冠微小動脈におけるブラジキニン投与後、内因性内皮由来過分極 / 過酸化水素の役割. 第 18 回日本 NO 学会学術集会. 2018
4. 矢田豊隆, 下川宏明, 立花博之. 近赤外線蛍光顕微鏡を用いた ICG の冠動脈内投与による反応性充血時の内皮由来過分極/過酸化水素の役割. 第 48 回日本心脈管作動物質学会. 2019
5. 矢田豊隆, 下川宏明. Role of Endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated Vasodilatation of Coronary Microvessels during Reactive Hyperemia in Dogs in Vivo. -An Infrared Fluorescence Microscopic Study-. 第 83 回日本循環器学会学術集会. 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：小笠原 康夫

ローマ字氏名：Ogasawara Yasuo

所属研究機関名：川崎医療福祉大学

部局名：医療技術学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10152365

研究分担者氏名：仲本 博

ローマ字氏名：Nakamoto Hiroshi

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 10299183

研究分担者氏名：佐々木 環

ローマ字氏名：Sasaki Tamaki

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 30187124

(2)研究協力者

研究協力者氏名：下川宏明

ローマ字氏名：Shimokawa Hiroaki